

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
平成 15 年度分担研究報告書

2003 年 8 月に大阪府で発生した腸管出血性大腸菌 O157 事例の
パルスフィールドゲル電気泳動法による解析

協力研究者 田口真澄 大阪府立公衆衛生研究所 細菌課
小林一寛 大阪府立公衆衛生研究所 細菌課
分担研究者 勢戸和子 大阪府立公衆衛生研究所 細菌課

研究要旨

2003 年に大阪府で発生した腸管出血性大腸菌(EHEC)O157 感染者数は 76 人で、その約 33%にあたる 25 人が 8 月の発生であった。短期間で多数発生した患者の感染源解明を目的として、分離された菌株のパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)解析を行った結果、A から I の 9 つの PFGE 型に型別された。もっとも多い A 型は 8 事例由来の 10 株 (40%) であり、この中の 4 事例で HUS 患者の発生がみられ diffuse outbreak が疑われたが喫食調査からは感染源につながる情報は得られなかった。

A. 研究目的

2003 年に大阪府（大阪市、堺市、東大阪市を除く）で発生した腸管出血性大腸菌(EHEC)O157 感染者数は 76 人で、その約 33%にあたる 25 人が 8 月の発生であり、HUS 患者の発生もみられた。短期間で多数発生した患者の感染源の解明と感染拡大の予防を目的として、分離された菌株のパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)解析を行い、事例間の関連性を検討した。

B. 研究方法

2003 年 8 月に発生した 5 例の家族内事例由来 12 株と、13 例の散発事例由来 13 株の計 25 株の EHEC O157 を供試菌株とした。

血清型別と生化学的性状の確認は常法にしたがって行い、毒素型別は PCR 法と VTEC-RPLA キット（デンカ生研）で実施した。薬剤感受性試験は ABPC、SM、TC、KM、CP、ST、TMP、GM、NA、FOM、CTX、CPFX、OFLX、NOR の 14 薬剤についてセンシディスク（BBL）を用いて KB 法で行った。

PFGE 法は供試菌株 DNA を制限酵素 *Xba*I で 37 ° C 4 時間消化後、CHEF DRIII (BIO-RAD) を使用し、1%アガロースで電圧 6V/cm、スイッチタイム 4-8 秒が 9 時間、8-50 秒 13 時間の計 22 時間電気泳動を行った。

電気泳動像の解析には FingerprintingII バージョン 3 (Bio-Rad) を用い、比較の設定は類似係数 Dice、デンドログラムタイ

UPGMA、トレランス設定は最適化 0%、トレランス 2.0%で行い、近似度 100%で型別を行った。

C. 研究結果と考察

2003 年の大阪府の EHEC 感染者数は、O157 が 76 人、他の血清型が 14 人の合計 90 人であった。発生月別にみると 8 月が最も多く、O157 が 25 人、他が 4 人であり、HUS と診断された事例は O157 検出例で 4 人、他の血清型が 1 人であった (図 1)。事例数では 8 月は 18 事例あり、家族内事例 5 例 (事例 No.1、2、3、4、5)、散発事例 13 例 (事例 No.6~18) であった (表 1)。事例 2 の 5 歳の男児と事例 11 の 4 歳の男児は同じ保育園の園児であったことから、関連が疑われたが、他の事例間については疫学調査結果から関連性は認められなかった。

8 月発生事例から検出された 25 株の O157 を FingerprintingII を用いて解析した結果は、A から I の 9 つの PFGE 型に型別され、最も多いものは、A 型の 10 株 (40%) であった (図 2)。

家族内事例のうち事例 2 以外の 4 事例は家族内で PFGE 型、血清型、Stx 型、薬剤耐性型が一致し、それぞれ共通の感染源の存在が考えられた。事例 2 では母と子供の PFGE 型と血清型が異なり、感染源が別であったか、あるいは複数の型に感染していたが一方の型のみ分離されたかのいずれかの理由が考えられた。この事例 2 の 5 歳の男児と事例 11 の 4 歳の男児は菌株の型が一致していた。

PFGE-A 型を検出した 8 事例 (事例 2、4、11、12、13、14、15、17) は大阪府の南

部の近接した 3 保健所管内で発生しており、地理的な集積がみられたことから diffuse outbreak が疑われた。当所の報告によって保健所が患者の喫食状況を再調査したが、感染源につながる情報は得られなかった。この 8 事例の 10 株は、国立感染症研究所が厚生労働行政総合情報システム (WISH) 上で公開している「PulseNet Japan」のデンドログラムでも他府県の株と異なった型であり、この型の今後の動向が注目される。さらに PFGE-A 型を検出した 10 人のうち 4 人が HUS を併発しており、この型を示す菌株の病原性についても調査する必要があると考えられた。

また、事例 3、9、10 は PFGE-B 型で SM・TC 耐性であり、他の事例とは異なる特徴のある菌株を検出した事例であったが、3 事例の発生地域は異なっており、喫食調査からも関連性が認められなかった。さらに、事例 8 と 18 は PFGE-D 型で同一型の菌であったが、関連は不明であった。

D. 結論

2003 年 8 月に発生した 18 事例のなかで、異なった事例間で同一の型を示し共通の感染源が示唆されるグループが 3 つ認められた (PFGE-A 型の 8 事例、PFGE-B 型の 3 事例、PFGE-D 型の 2 事例) が、感染源の解明には至らなかった。菌株の解析結果を疫学調査に迅速に反映させ、感染源が解明される事例を増やすことが今後の課題であると考えられる。

E. 研究発表

なし

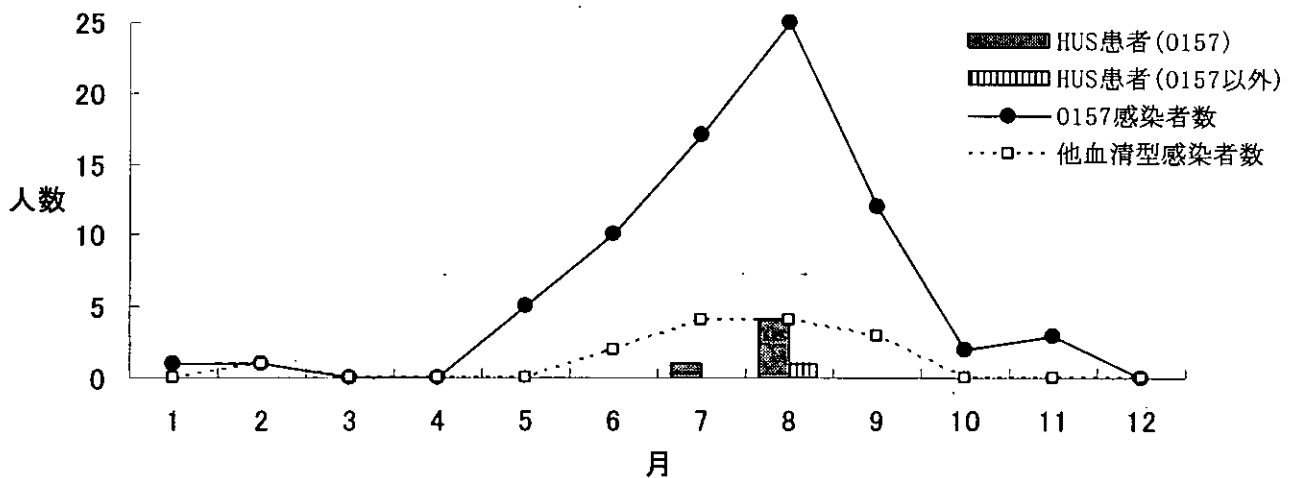
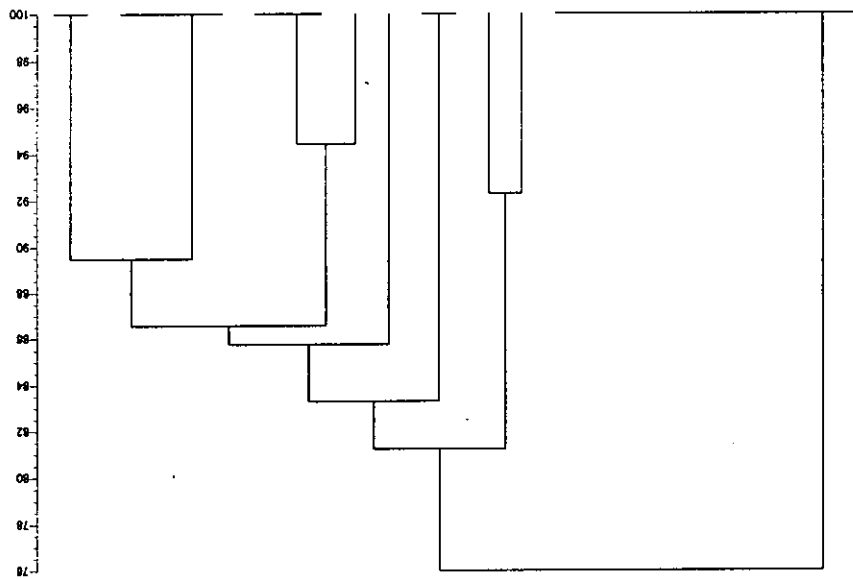


図1 2003年大阪府のEHEC発生数

表1 18事例由来25株の型

事例	性別	年齢	発症日 (検体採取日)	症状	菌株 No.	血清型	Stx	薬剤耐性	PFGE型
1	M	2	8/5	有	PV 03-58	O157:H7	2	感受性	C
	M	33	8/6	有	PV 03-61	O157:H7	2	感受性	C
	F	33	8/8	有	PV 03-62	O157:H7	2	感受性	C
2	F	27	(8/24)	無	PV 03-65	O157:H7	2	感受性	F
	M	5	8/18	有	PV 03-64	O157:HNM	2	感受性	A
3	M	5	8/25	有	PV 03-81	O157:H7	2	SM・TC	B
	F	10	8/27	有	PV 03-87	O157:H7	2	SM・TC	B
4	M	10	8/26	有・HUS	PV 03-71	O157:HNM	2	感受性	A
	M	4	(9/1)	無	PV 03-75	O157:HNM	2	感受性	A
	M	8	8/31	有	PV 03-76	O157:HNM	2	感受性	A
5	F	40	(8/26)	無	PV 03-67	O157:HNM	1&2	SM	E
	F	5	(8/26)	無	PV 03-68	O157:HNM	1&2	SM	E
6	F	18	8/14	有	PV 03-63	O157:H7	1&2	感受性	H
7	M	21	8/15	有	PV 03-70	O157:H7	1&2	感受性	I
8	M	10	8/21	有	PV 03-73	O157:H7	2	感受性	D
9	M	13	8/22	有	PV 03-74	O157:H7	2	SM・TC	B
10	F	4	8/24	有	PV 03-80	O157:H7	2	SM・TC	B
11	M	4	8/24	有	PV 03-66	O157:HNM	2	感受性	A
12	M	2	8/26	有	PV 03-69	O157:HNM	2	感受性	A
13	M	8	8/27	有・HUS	PV 03-72	O157:HNM	2	感受性	A
14	M	8	8/28	有	PV 03-85	O157:HNM	2	感受性	A
15	F	3	8/28	有・HUS	PV 03-83	O157:HNM	2	感受性	A
16	M	4	8/28	有	PV 03-84	O157:H7	1&2	感受性	G
17	F	6	8/29	有・HUS	PV 03-79	O157:HNM	2	感受性	A
18	F	64	(8/30)	無	PV 03-89	O157:H7	2	感受性	D

Disc (Total 2.0g) (H₂O:0.5g S:0.5g) (0.0g-100.0g)
BioRad03STEC



菌株 No.	血清型	Stx	PFGE 型
PV03-73	O157:H7	2	D
PV03-89	O157:H7	2	D
PV03-80	O157:H7	2	B
PV03-87	O157:H7	2	B
PV03-74	O157:H7	2	B
PV03-81	O157:H7	2	B
PV03-58	O157:H7	2	C
PV03-61	O157:H7	2	C
PV03-62	O157:H7	2	C
PV03-65	O157:H7	2	F
PV03-84	O157:H7	1&2	G
PV03-67	O157:NM	1&2	E
PV03-68	O157:NM	1&2	E
PV03-70	O157:H7	1&2	I
PV03-63	O157:H7	1&2	H
PV03-64	O157:NM	2	A
PV03-66	O157:NM	2	A
PV03-69	O157:NM	2	A
PV03-71	O157:NM	2	A
PV03-75	O157:NM	2	A
PV03-76	O157:NM	2	A
PV03-72	O157:NM	2	A
PV03-79	O157:NM	2	A
PV03-85	O157:NM	2	A
PV03-83	O157:NM	2	A

図 2 25 株のデンドログラム

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成15年度分担研究報告書

食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究

分担研究者	田中 博	愛媛県立衛生環境研究所
研究協力者	安岡富久 谷脇 妙	高知県衛生研究所
	谷 好史	徳島県保健環境センター
	吉田紀美	愛媛県立衛生環境研究所
	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
	角森よしえ	島根県保健環境科学研究所
	富田正章	山口県環境保健研究センター
	榊美代子 妹尾正登	広島県保健環境センター
	河本秀一 橋渡佳子	広島市衛生研究所

研究要旨

食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究の一環として、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）の標準化と PFGE により解析された画像を基盤とした分散型情報システム（パスネット）構築のため、検査施設間における PFGE 技術の精度管理を行った。精度管理には中・四国地区の地方衛生研究所（地研）8 施設が参加し、*Salmonella Enteritidis*（サルモネラ）4 株と腸管出血性大腸菌 O157（O157）4 株を供試菌株として、新しいのプロトコールによる PFGE を実施した。さらに、異なった2つの集菌方法による PFGE 画像の影響についても比較・検討を加えた。

精度管理の結果、ほとんどの施設で概ね良好な画像が得られた。また、画像をもとに画像解析ソフトで解析を行い施設間の差異を確認したところ、サルモネラおよび O157 ともタイプのことなる4株はそれぞれ異なるクラスターを形成（近以性 90%以上）したが、同一菌株の一部に集菌方法などの技術的問題または菌株の変異に起因すると推察される差異が認められた。今後、これらの技術的問題点の改善が必要と思われた。

A. 研究目的

平成12年度から中・四国地区の各地研がパスネット構築の基礎的資料を得るため、PFGE 解析の有効性と技術的問題点について共同研究を行ってきた。その結果、PFGE 解析は細菌性食中毒や感染症の疫学調査に有効な手段となることが明らかとなった反面、パスネットを構築し、円滑に運用するには

PFGE 技術の問題点を改善し、標準化する必要性が示唆された。

今回の精度管理では、中・四国の各地研が従来から行ってきた国立感染症研究所（感染研）で平成9年に作成した技術マニュアルに準拠した方法（従来法）に替えて、米国 CDC のプロトコールをもとに新たに作成した PFGE のプロトコール（感染研ニュープロト

コール) により、サルモネラおよび O157 について PFGE を行い、新しいプロトコールで PFGE を実施した場合の技術的問題点を指摘・改善していくことを目的とした。

B. 研究方法

1. 参加施設

愛媛県立衛生環境研究所、高知県衛生研究所、徳島県保健環境センター、岡山県環境保健センター、島根県保健環境科学研究所、山口県環境保健研究センター、広島県保健環境センター、広島市衛生研究所

2. 供試菌株

供試菌株として広島市衛生研究所が胃腸炎患者から分離した *Salmonella* Enteritidis と国立感染症研究所から分与を受けた腸管出血性大腸菌 O157 : H7 各 4 株を使用した。

Salmonella Enteritidis

- ・菌株番号 1 (広島市衛研番号 01170 集団例)
- ・菌株番号 2 (広島市衛研番号 01106 散発例)
- ・菌株番号 3 (広島市衛研番号 01092 散発例)
- ・菌株番号 4 (広島市衛研番号 01080 散発例)

腸管出血性大腸菌 O157 : H7

- ・菌株番号 1 (感染研番号 021533 II a II a I)
- ・菌株番号 2 (感染研番号 020095 III a ND III)
- ・菌株番号 3 (感染研番号 020021 VII ND III)
- ・菌株番号 4 (感染研番号 020049 V a ND ND)

3. PFGE

方法は感染研ニュープロトコールに準拠した。詳細は次のとおりである。

1) 菌株の菌量調整とアガロースブロック包埋

サルモネラおよび O157 とも 2 通りの集菌方法を試み、比較した。プレートからの集菌方法として、35~37°C で 16~18 時間培養したトリプトソイ寒天平板上の菌苔を 1 μ l のプラスチックエーゼで 1 白金耳量をできるだけ正確にかき取り、200 μ l の滅菌蒸留水に懸濁した。この懸濁液に 200 μ l の 1%

Seakem Gold Agarose (Cambrex) を加えて混ぜ、その混合液を Sample Plug Caster、0.7mm (Bio-Rad) へ流し込み、室温で 10~15 分間 (4°C で 5 分間) 固化させた (プレート法)。一方、ブイヨンからの集菌方法としてトリプトソイブイヨン 3ml で 35~37°C、16~18 時間静置培養した菌液 200 μ l を 1.5ml のマイクロチューブに移し、12,000rpm で 2 分間遠心した。遠心後、上清を除去、沈渣に滅菌蒸留水 200 μ l を加え、懸濁した。この懸濁液にプレート法と同様、200 μ l の 1% Seakem Gold Agarose を加え、その混合液を Sample Plug Caster で固化させた (ブイヨン法)。

2) 菌体処理 (Proteinase K)

固まったプラグを 1 mg/ml Proteinase K, (Roche) 1% N-Lauroylsarcosine (Sigma) in 0.5M EDTA, pH8.0 溶液 1 ml の入ったチューブに移し、50°C で 2 時間、振盪培養した。

3) 制限酵素処理 (前処理)

アガロースブロックを取り出し、泳動時用の大きさ (4 mm \times 4 mm) にカットした。この断片を 4 mM Pefabloc SC (Roche) in TE 1 ml の入ったマイクロチューブに移し、50°C で 20 分間の洗浄を 2 回行った。さらに、バッファーを TE (1 ml/sample) に替え、氷上で 20 分以上平衡化した。

4) 制限酵素処理 (バッファーによる平衡化)

TE buffer を抜き取り、酵素処理のための H buffer (200 μ l/sample) を加え、氷上で 20 分間培養した。

5) 制限酵素処理 (消化反応)

100 μ l の酵素を含むバッファー (30 units/sample) に置き換え、37°C で一昼夜、振盪培養を行った。酵素処理の終わったサンプルには、0.5 倍の TBE buffer を 400 μ l 加え反応を停止した。なお、サルモネラに対しては制限酵素 *Bln* I (Roche) を、O157 に対しては制限酵素 *Xba* I (Roche) を使用した。

6) コムへの貼り付け

プラグをコムの泳動方向面に静置、5～10分間乾燥させた後、ゲル作製台にセットし、55～60℃に保温した1% SeaKem Gold Agarose(0.5倍のTBE bufferで溶解)100mlを流し込み、泳動用アガロースゲルを作製した。

7) 泳動槽の設定・泳動条件

予め4℃に保存しておいた0.5倍のTBE buffer 2リットルを水平に設定した泳動槽に加えた後、泳動用ゲルを泳動槽に配置した。泳動条件は、6.0V/cm、2.2～54.2 s、19時間、バッファー温度は14℃に設定した。なお、DNAサイズマーカーとして*S. Braenderup* H9812を用いた。

8) ゲルの染色・写真撮影

泳動後のゲルを0.2 μg/ml Ethidium bromide 水溶液で30分間染色、染色後、蒸留水で30分間脱色し、Transilluminator上でポラロイドカメラにて撮影した(1施設はCCDカメラで撮影)。

4. 画像解析

各施設で写真撮影された画像を電子メールまたは郵送でサルモネラの画像は広島市衛生研究所に、O157の画像は愛媛県立衛生環境研究所に集め、画像解析ソフト(Fingerprinting II、Bio-Rad)を用いてクラスター解析を行った。

C. 研究結果

1. 各施設のPFGE画像の比較

今回、8施設(A～H施設)が統一方法で作製したサルモネラおよびO157のPFGE画像(図1～8、図18～25)は、1施設(H施設)の画像を除き概ね良好で、画像を比較することができた。H施設の画像はサルモネラ、O157とも不明瞭であったが、これは技術的な問題によるものではなく泳動装置

の不良によるものであった。一方、画像をCCDカメラで撮影したB施設の画像(図2、図19)は他施設の画像と比べ若干粗く(小さな粗い粒子が浮き出た状態)感じられた。さらに、菌株の変異によるものと推察されるバンドの欠損(図18、Lane10)も認められた。

2. 各施設間の画像解析

画像をもとに画像解析ソフトでデンドログラムを作成し、施設間の差異を確認した結果、比較することのできた7施設の画像(図9、図10、図26、図27)ではサルモネラ、O157とも同一菌株は同じクラスターを形成し、その類似度は100～90%であった。集菌方法を異にした場合でも同様な傾向を示したが、O157ではプレートからの集菌よりブイヨンからの集菌方法の類似度がやや高くなる傾向を示した。

3. 集菌方法の違いによる画像の比較

2種類の集菌方法で行ったPFGEの画像を比較したところ、サルモネラの2株がスミア一状になったB施設の画像(図2、図12)を除いて各施設とも比較的高い類似度(95～100%)で、同様なクラスターを示した。しかし、プレートから集菌してPFGEを行った画像のバンドはやや厚くなり、バンドの数が認識し難く、解析結果に差異を生じる傾向を示した。(図11～16)

D. 考察

米国ではCDCが中心になり、パルスネットを構築し、diffuse outbreakの発見に成果を上げている。将来、地球規模でのネットワークを構築するには、統一したプロトコールで実施する必要がある。感染研はCDCの方法に準じた感染研ニュープロトコールを作成した。今回、中・四国地区の10地研で、この新しいプロトコールにもとづいたPFGEの方法を習得することとした。習得後、8施

設で精度管理を行った結果、7施設ではほぼ明瞭な画像を得ることができたため中・四国地区の大部分の地研は新しいプロトコールによる PFGE の方法が取得されたと考えられる。

新しいプロトコールの方法と従来法の主な相違点はアガロースブロックの作製過程にあり、前者は Seakem Gold Agarose を菌体と混和後 Sample Plug Caster(0.7mm)へ流し込み、後者は低融点アガロースを菌体と混和後 plug mold (1.4mm) へ流し込みブロックを作製する。そのため、今回の精度管理で得られた画像ではブロックの厚さが薄いため、昨年度までの研究で実施した精度管理の画像よりもシャープなバンドが得られた。このことは画像解析時に有利になると思われた。

一方、集菌方法の違いによる画像の比較では、プレートからの集菌方法がブイヨンからの集菌方法に比べ濃度が濃くなる傾向が見られた。従って、画像のバンドも大きくなり、

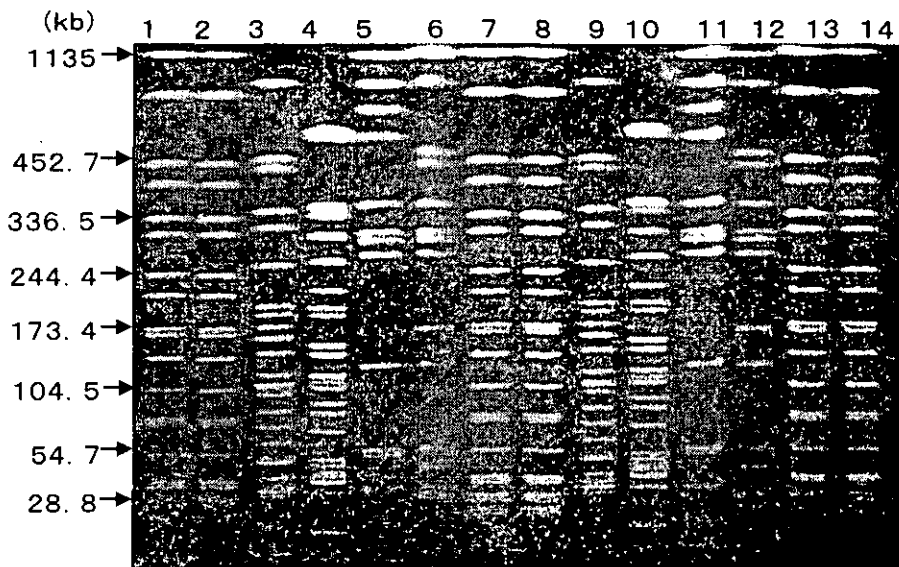
解析時のバンド認識が難しくなった。逆にブイヨンからの集菌方法では分子量の小さい領域のバンドが薄くなる傾向が見られ、新しいプロトコールの方法でも集菌方法は解析画像に影響する要因となった。今後、これら技術的問題点の改善が必要と思われた。

E. 結論

中・四国地区の8地研で、感染研ニュープロトコールによる PFGE を行い、精度管理を実施したところ、1施設を除いて概ね明瞭な PFGE 画像を得ることができた。また、画像解析の結果も概ね良好であったが、技術的問題点も認められた。今後、これらの問題点の改善と更なる PFGE 解析手法の標準化が必要と思われた。

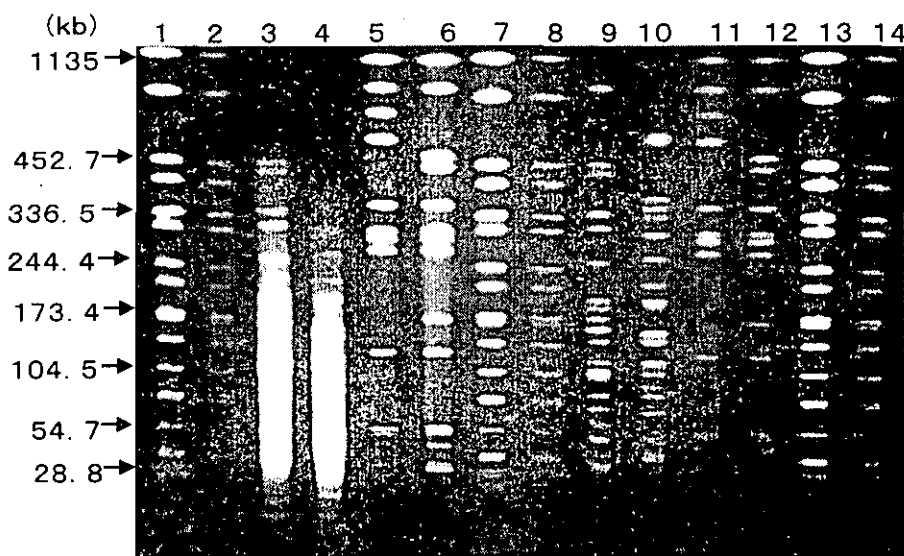
F. 研究発表

なし



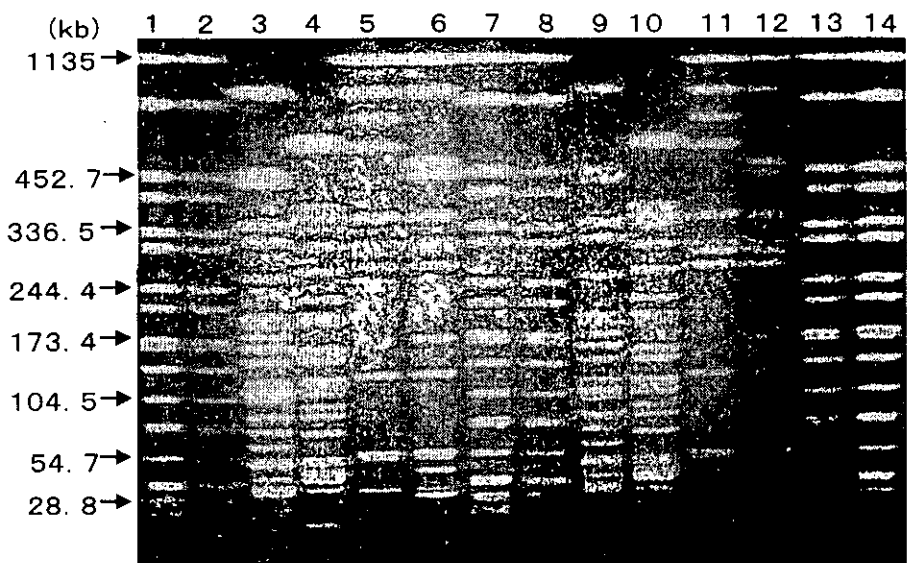
- Lane
- 1 marker プレート
 - 2 marker ブイオン
 - 3 菌株1 プレート
 - 4 菌株2 プレート
 - 5 菌株3 プレート
 - 6 菌株4 プレート
 - 7 marker プレート
 - 8 marker ブイオン
 - 9 菌株1 ブイオン
 - 10 菌株2 ブイオン
 - 11 菌株3 ブイオン
 - 12 菌株4 ブイオン
 - 13 marker プレート
 - 14 marker ブイオン

図1 A施設のPFGE画像(サルモネラ)



- Lane
- 1 marker プレート
 - 2 marker ブイオン
 - 3 菌株1 プレート
 - 4 菌株2 プレート
 - 5 菌株3 プレート
 - 6 菌株4 プレート
 - 7 marker プレート
 - 8 marker ブイオン
 - 9 菌株1 ブイオン
 - 10 菌株2 ブイオン
 - 11 菌株3 ブイオン
 - 12 菌株4 ブイオン
 - 13 marker プレート
 - 14 marker ブイオン

図2 B施設のPFGE画像(サルモネラ)



- Lane
- 1 marker プレート
 - 2 marker ブイオン
 - 3 菌株1 プレート
 - 4 菌株2 プレート
 - 5 菌株3 プレート
 - 6 菌株4 プレート
 - 7 marker プレート
 - 8 marker ブイオン
 - 9 菌株1 ブイオン
 - 10 菌株2 ブイオン
 - 11 菌株3 ブイオン
 - 12 菌株4 ブイオン
 - 13 marker ブイオン
 - 14 marker プレート

図3 C施設のPFGE画像(サルモネラ)

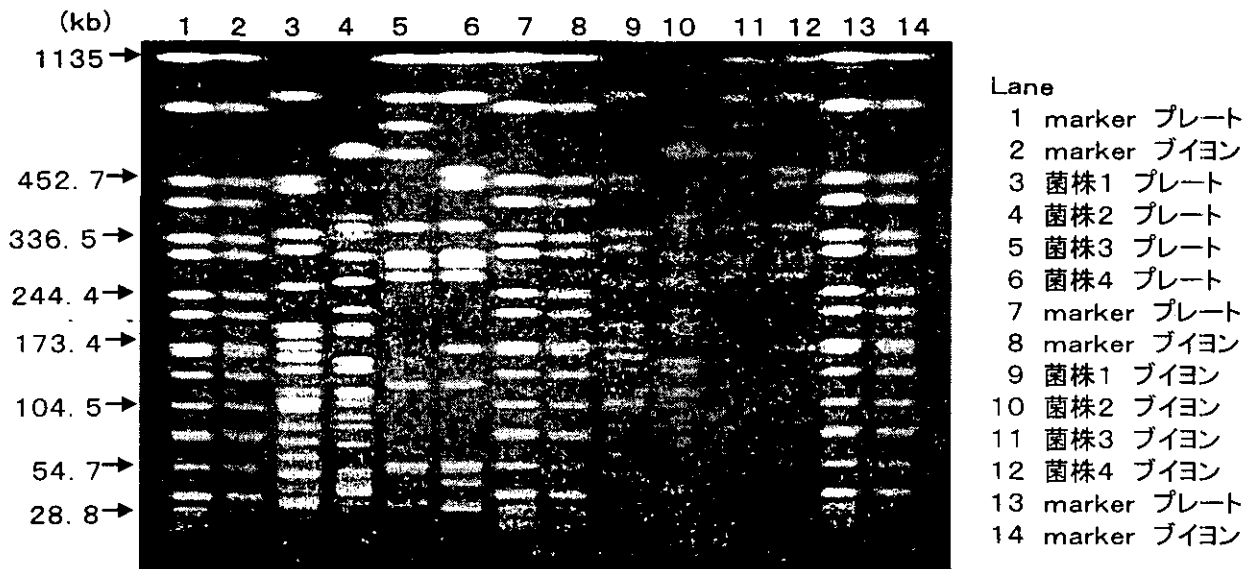


図4 D施設のPFGE画像(サルモネラ)

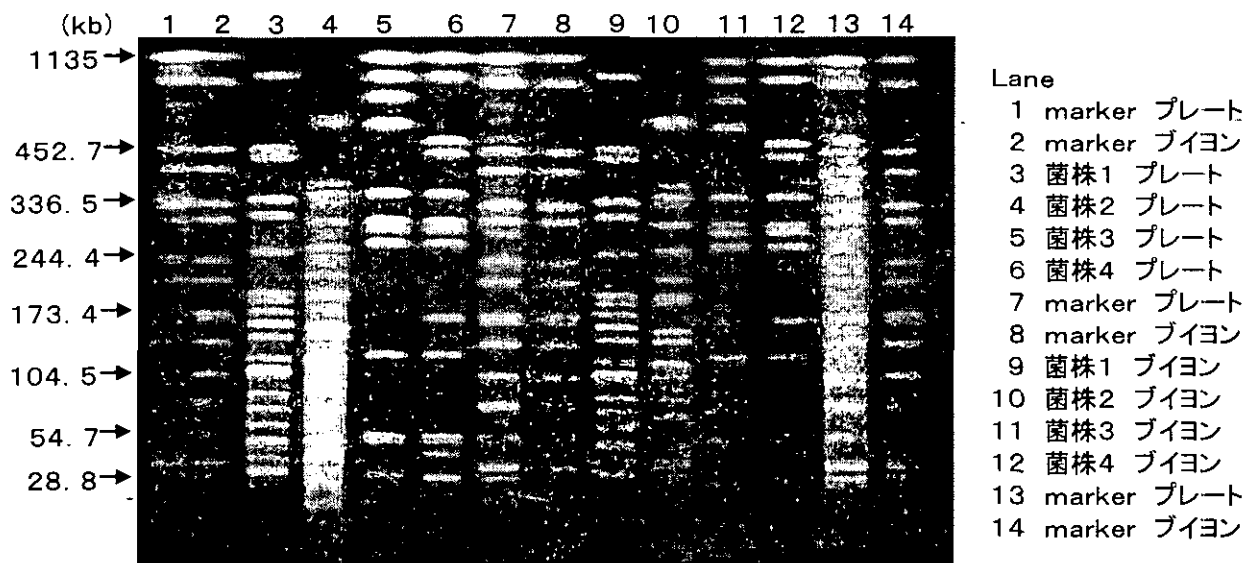


図5 E施設のPFGE画像(サルモネラ)

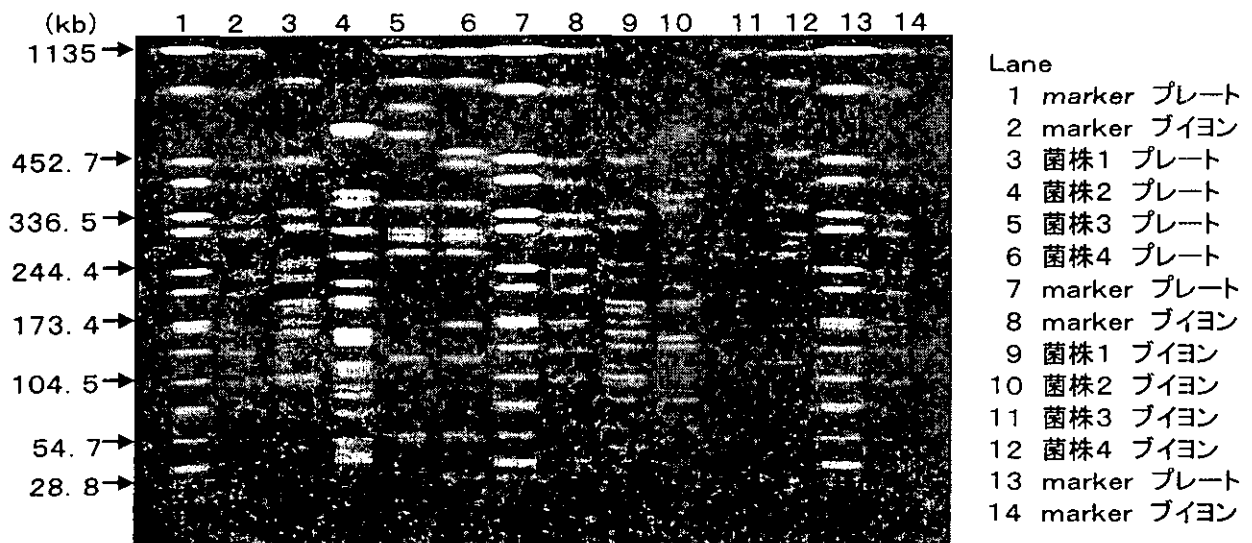


図6 F施設のPFGE画像(サルモネラ)

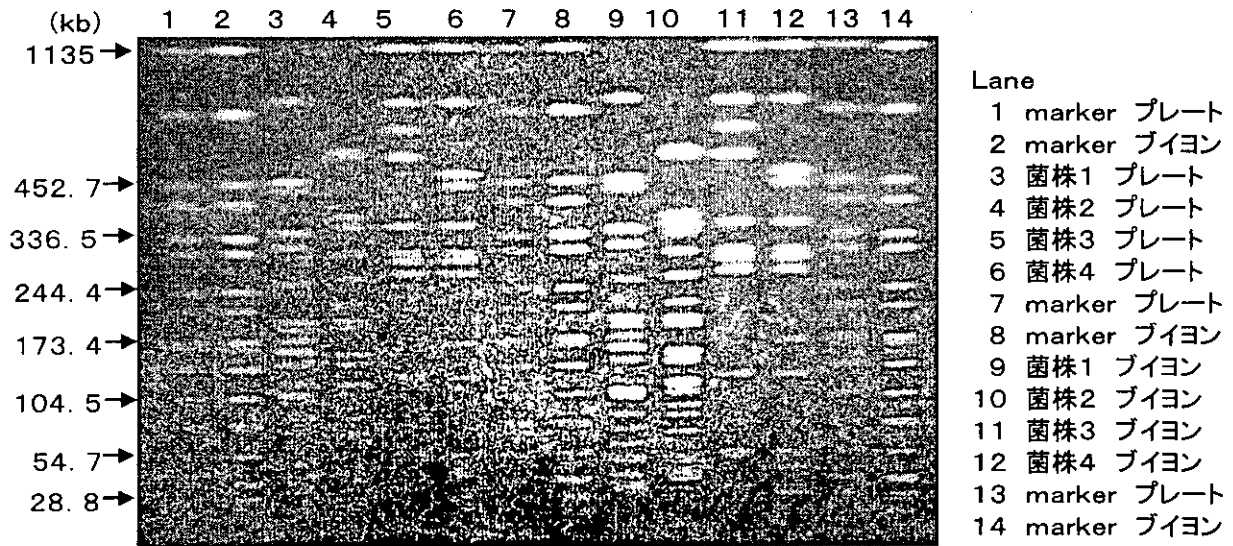


図7 G施設のPFGE画像(サルモネラ)

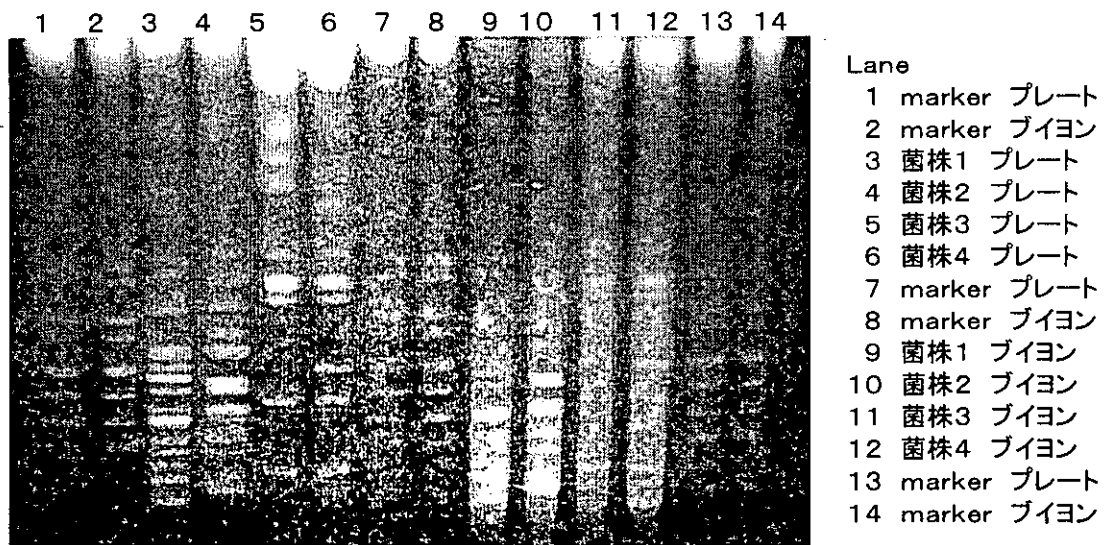


図8 H施設のPFGE画像(サルモネラ)

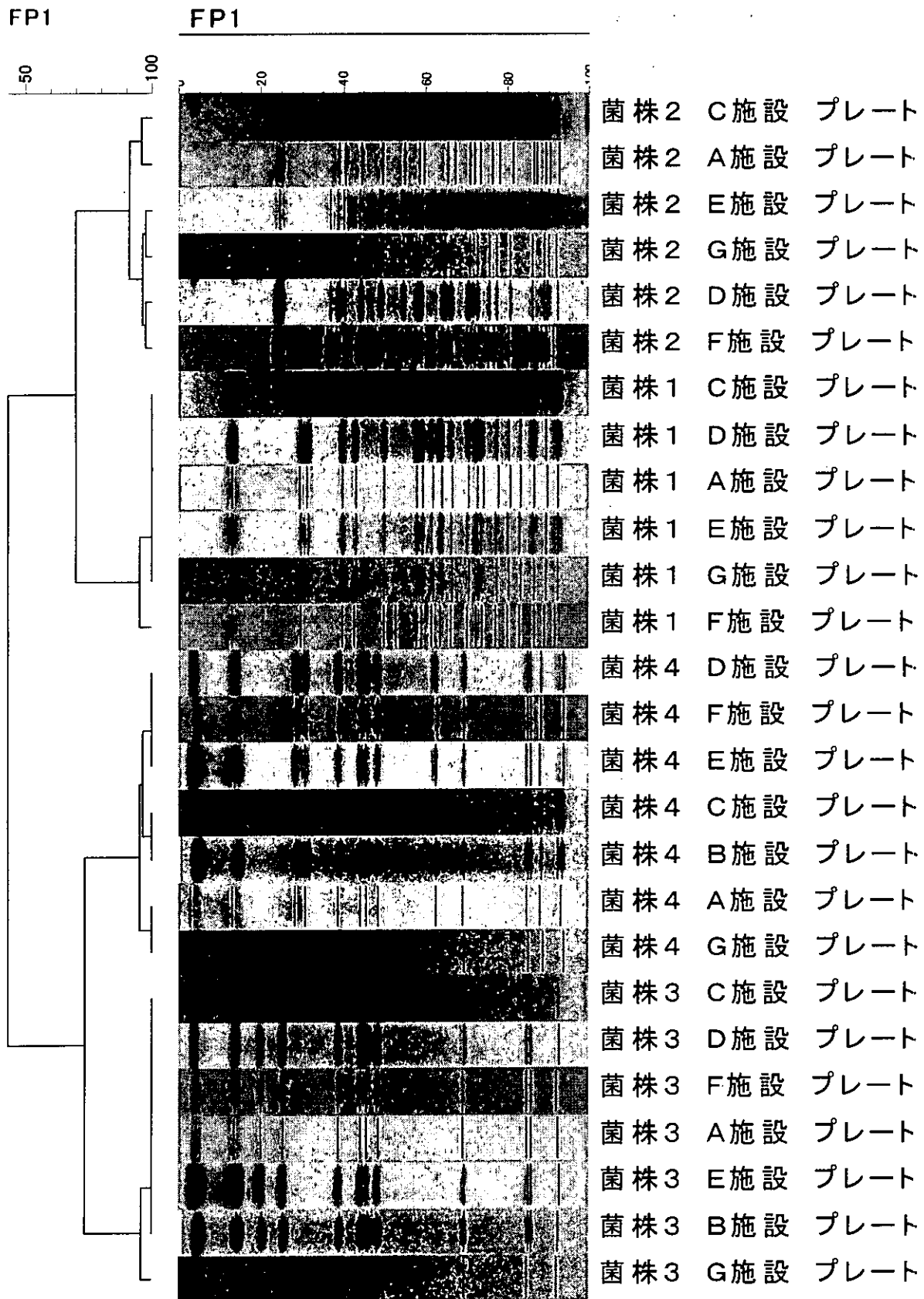


図9 各施設間のサルモネラ(プレート)デンドログラム

FP1

FP1

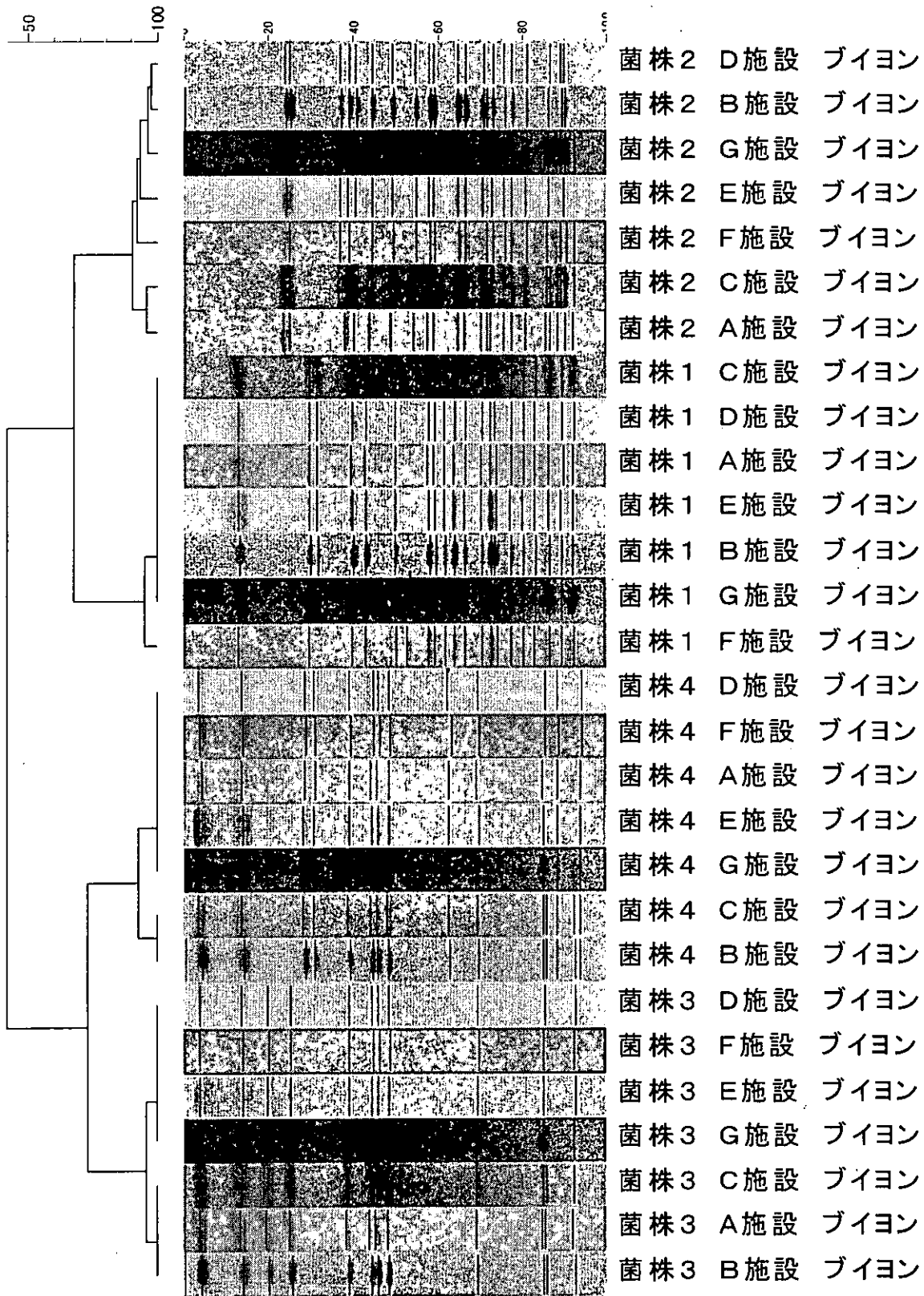


図10 各施設間のサルモネラ(ブイオン)デンドログラム

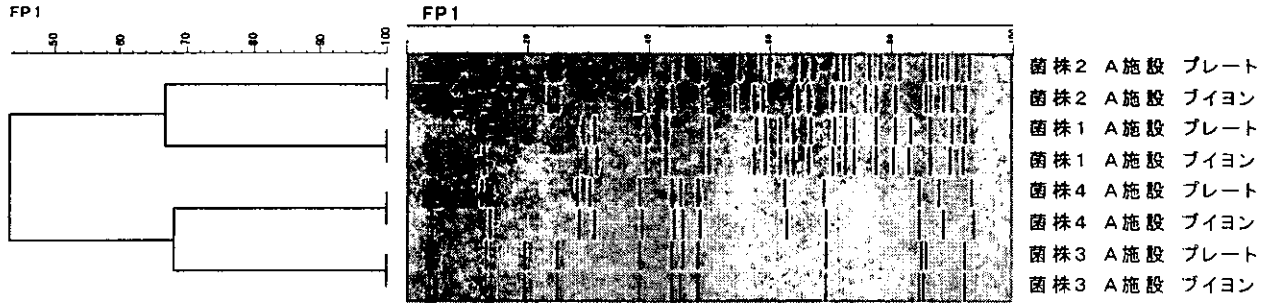


図11 A施設のデンドログラム

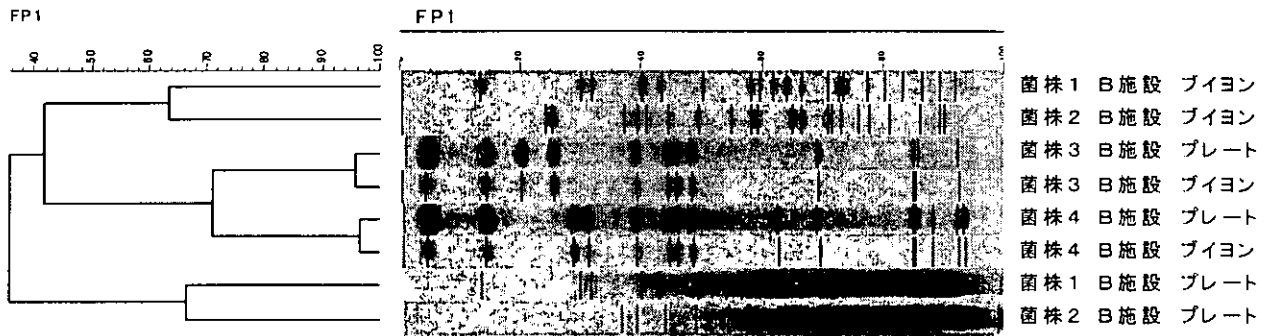


図12 B施設のデンドログラム

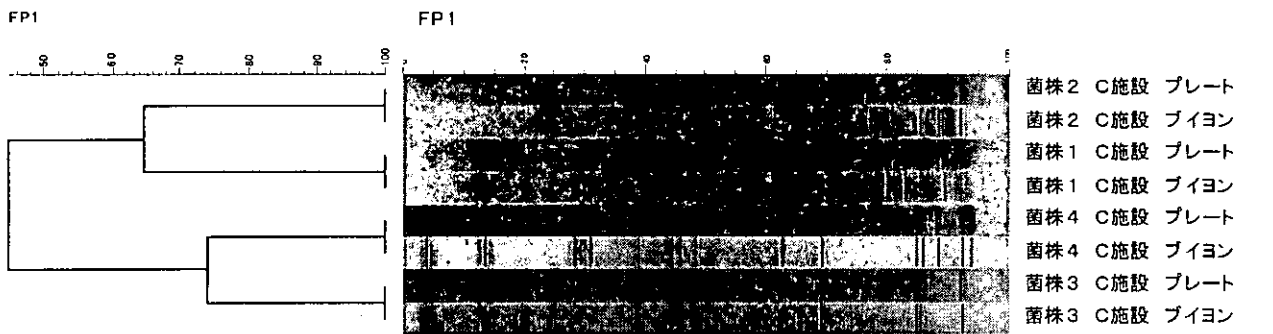


図13 C施設のデンドログラム

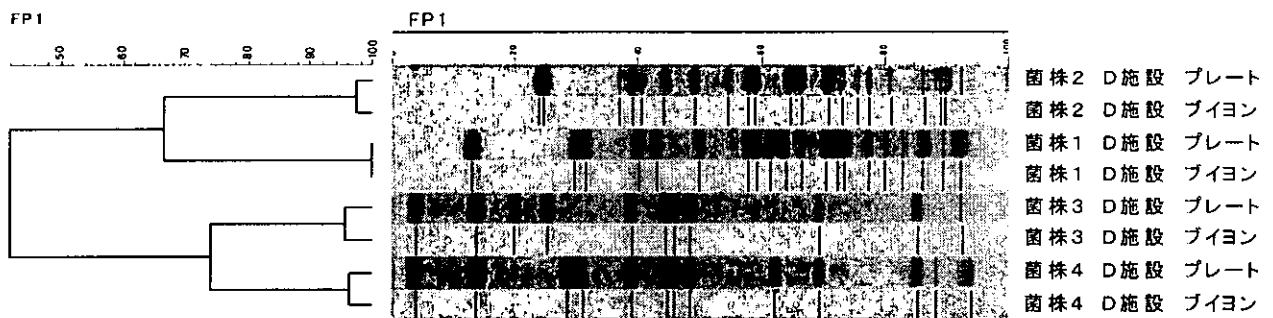


図14 D施設のデンドログラム

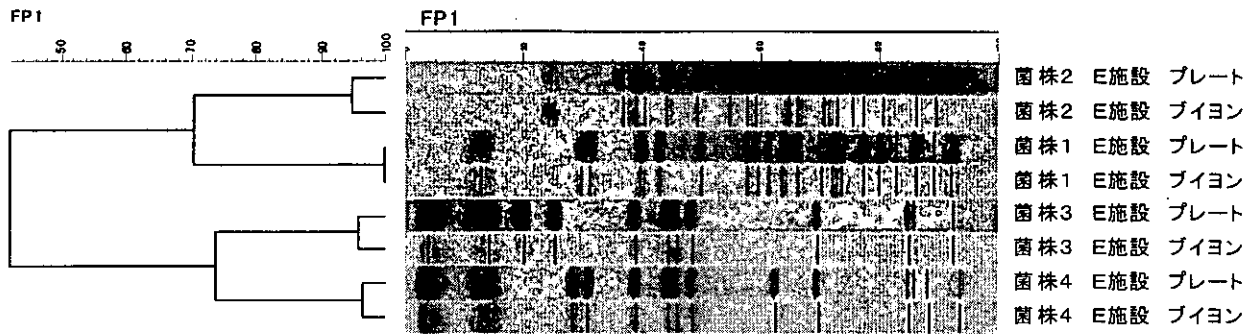


図15 E施設のデンドログラム

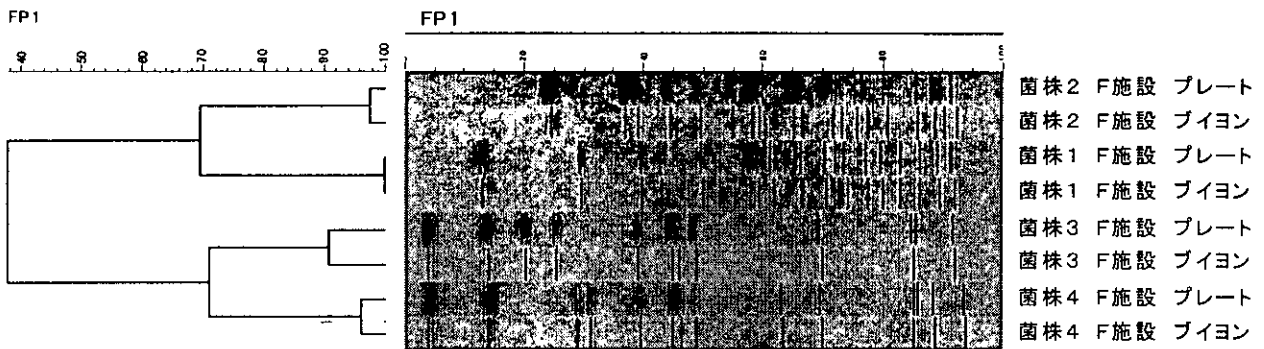


図16 F施設のデンドログラム

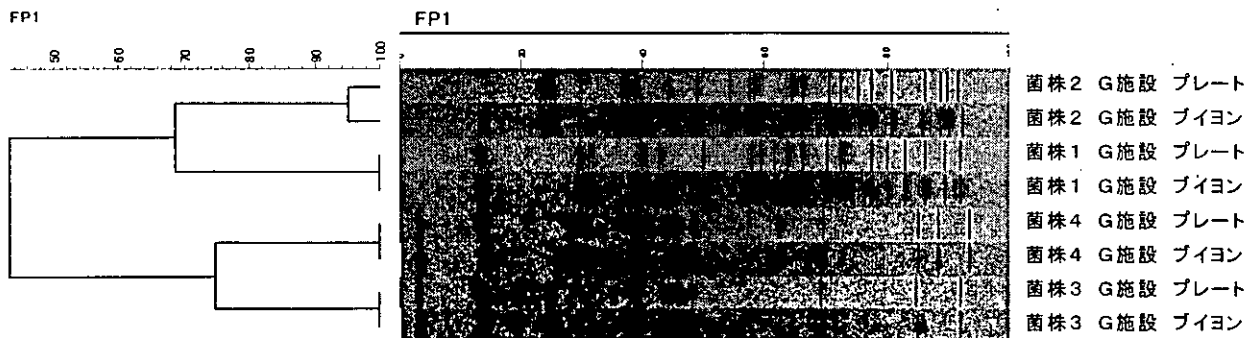


図17 G施設のデンドログラム

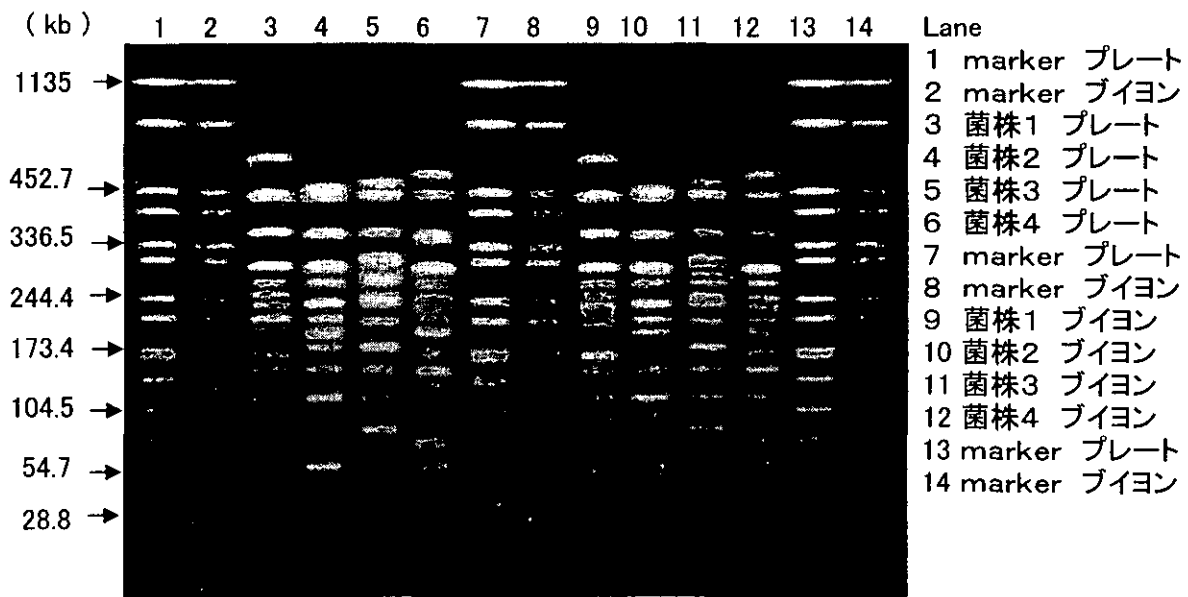


図18 A施設のPFGE画像(O157)

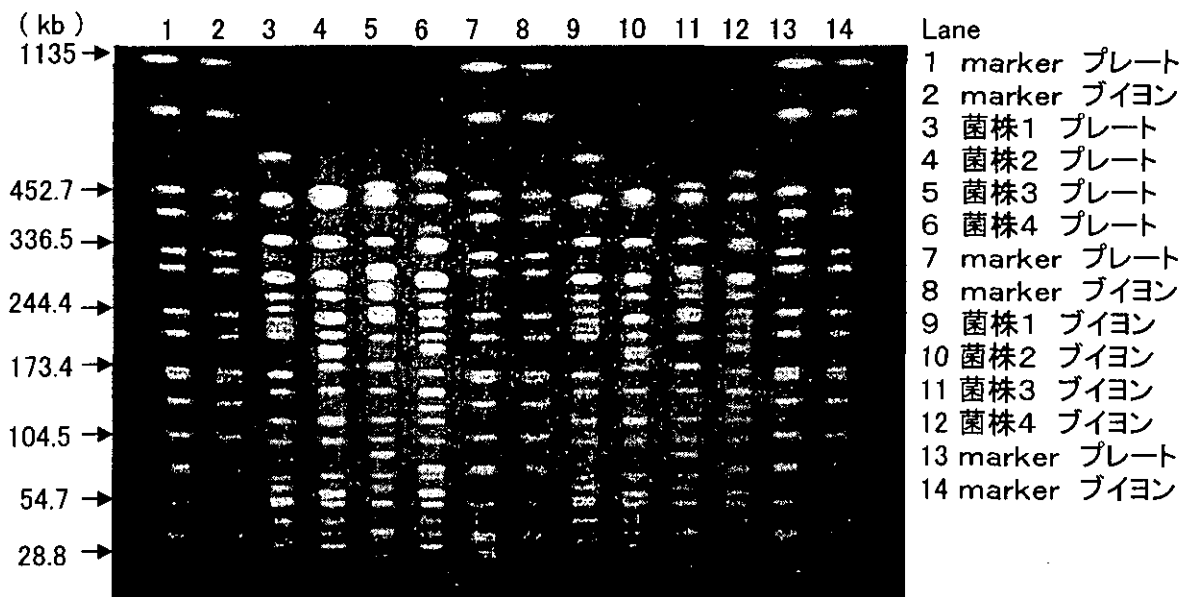


図19 B施設のPFGE画像(O157)

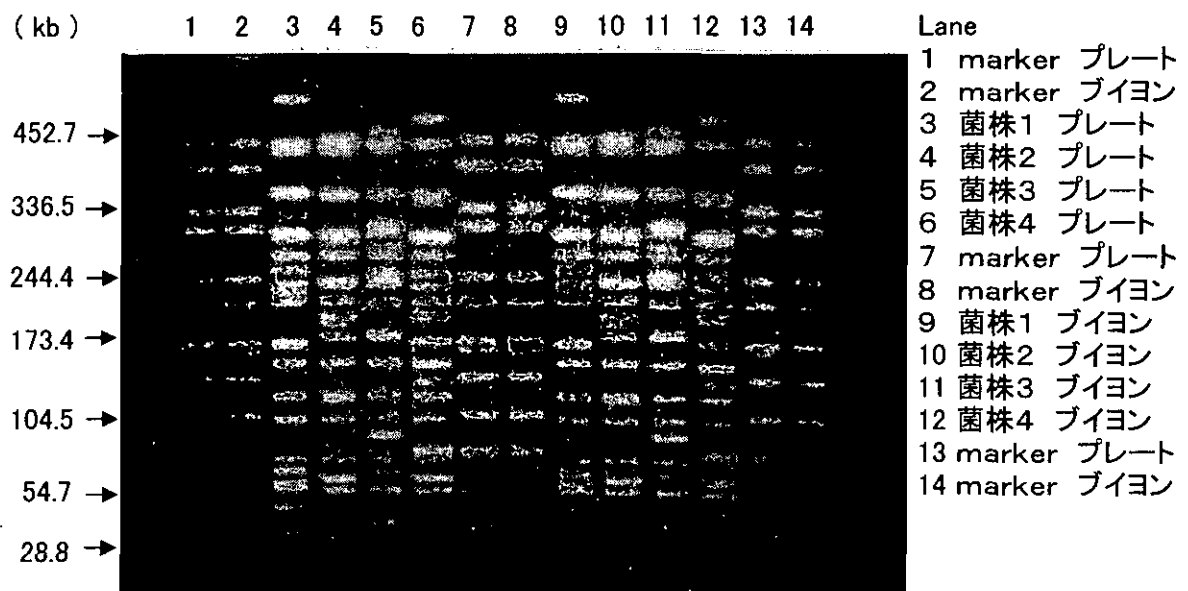


図20 C施設のPFGE画像(O157)

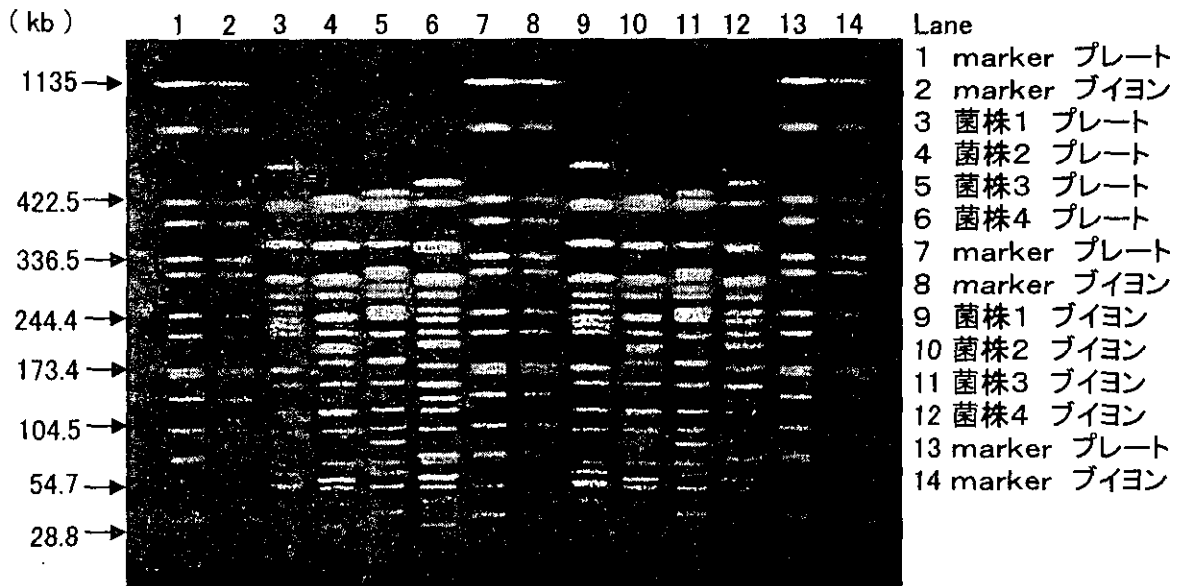


図21 D施設のPFGE画像(O157)

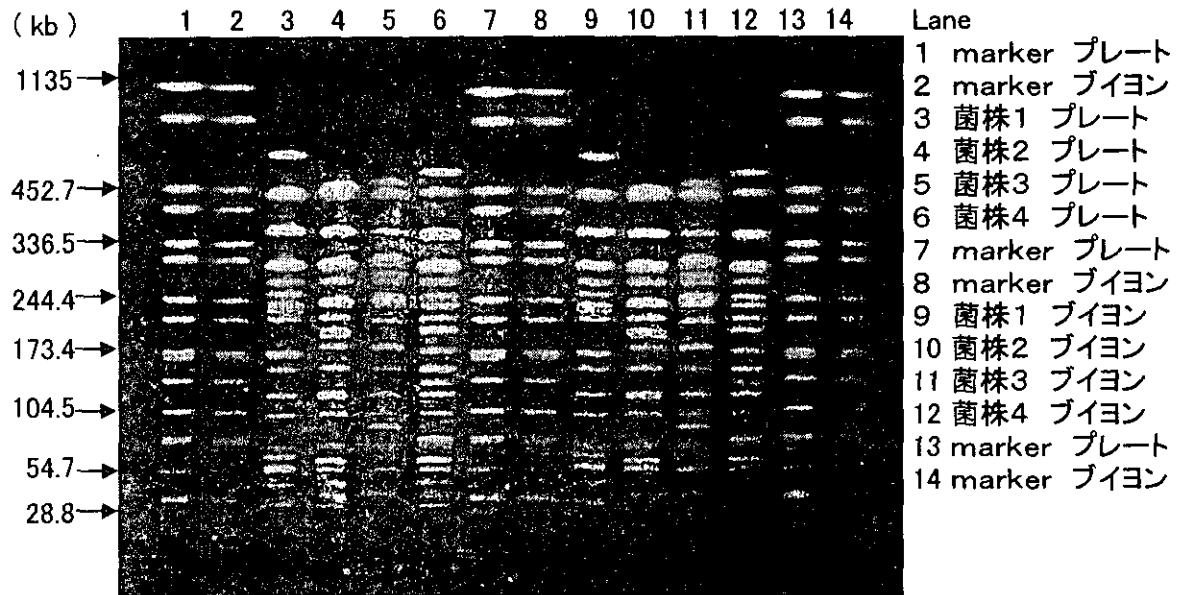


図22 E施設のPFGE画像(O157)

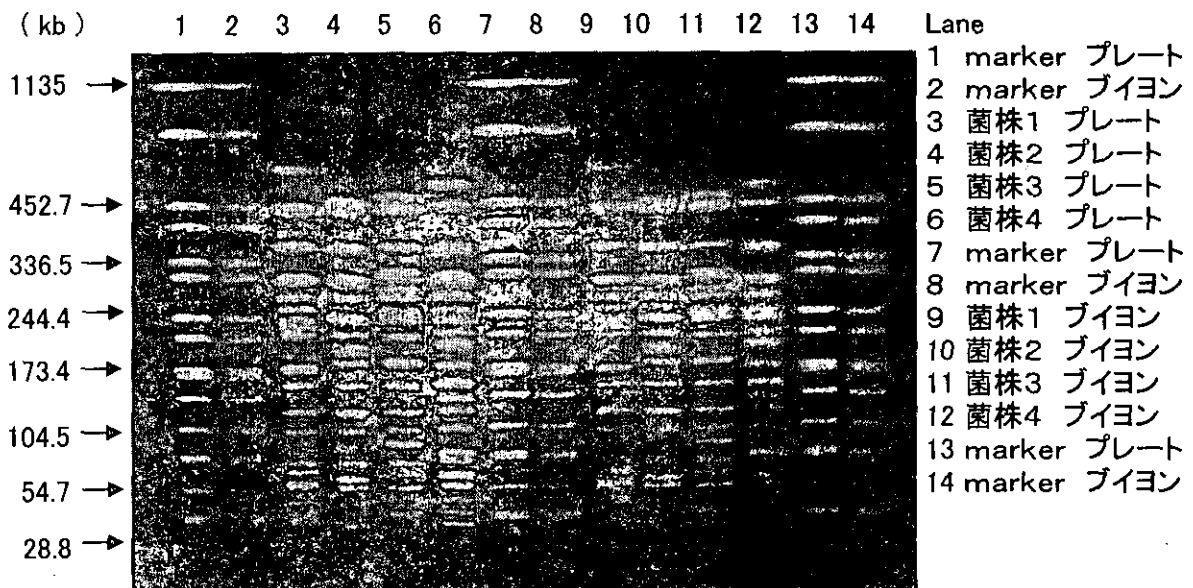


図23 F施設のPFGE画像(O157)

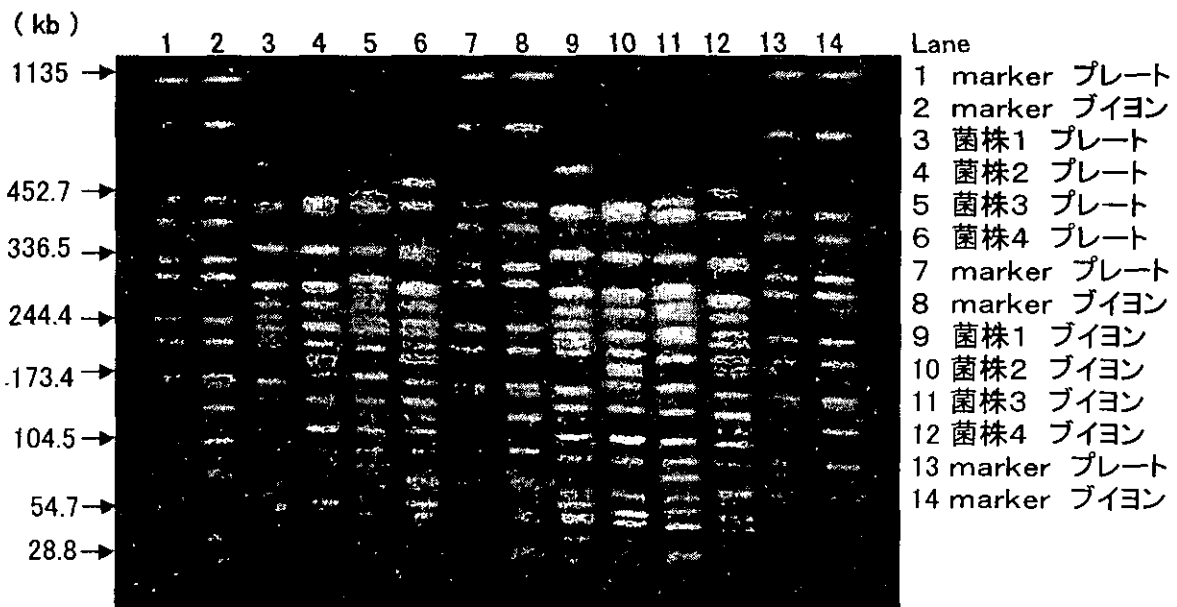


図24 G施設のPFGE画像(O157)

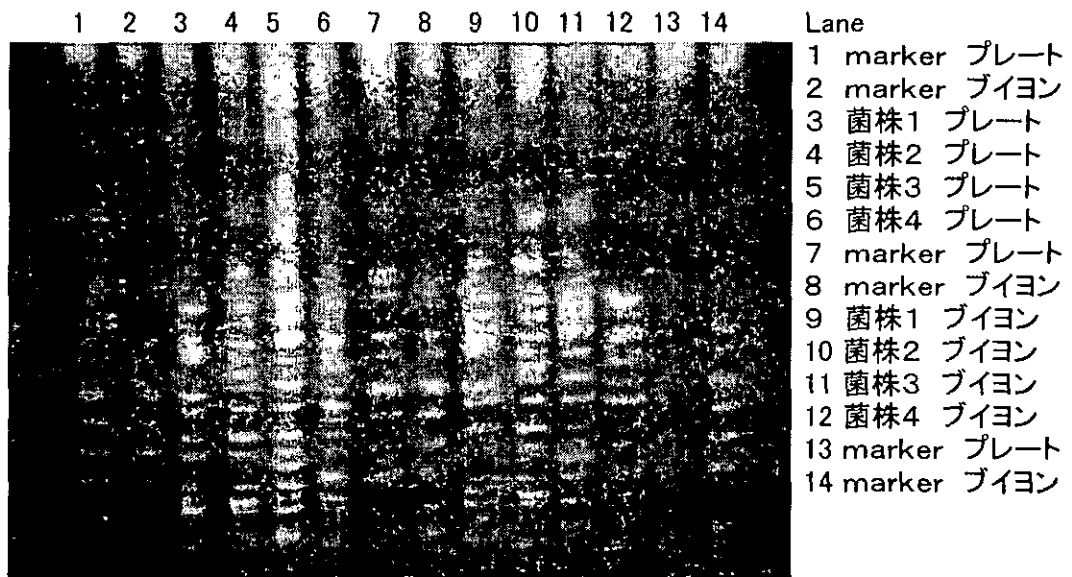


図25 H施設のPFGE画像(O157)

Dice(Td:1.2%-1.2% 0-0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
 FP1

FP1

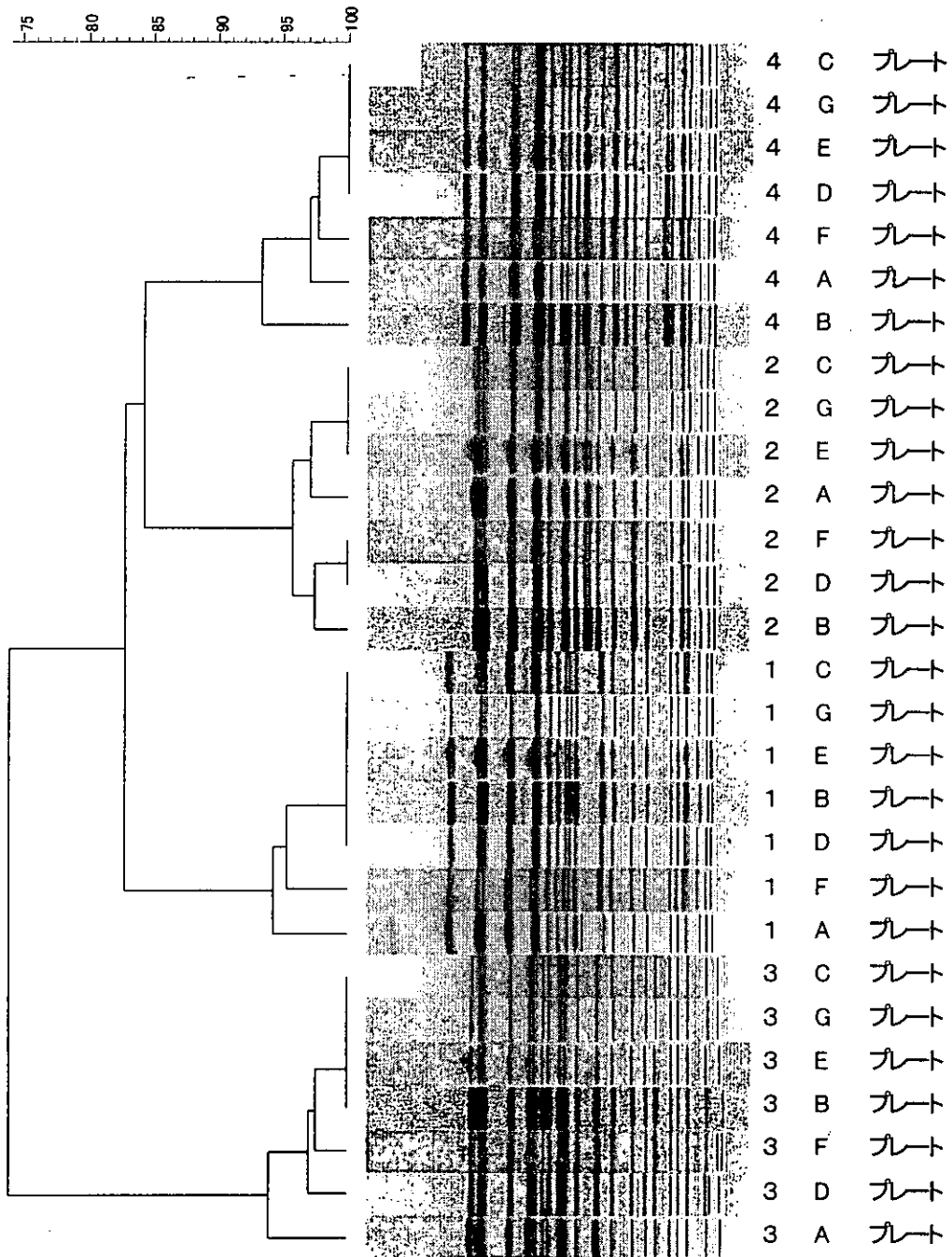


図 2 6 各施設間の 0157 (プレート) デンドログラム

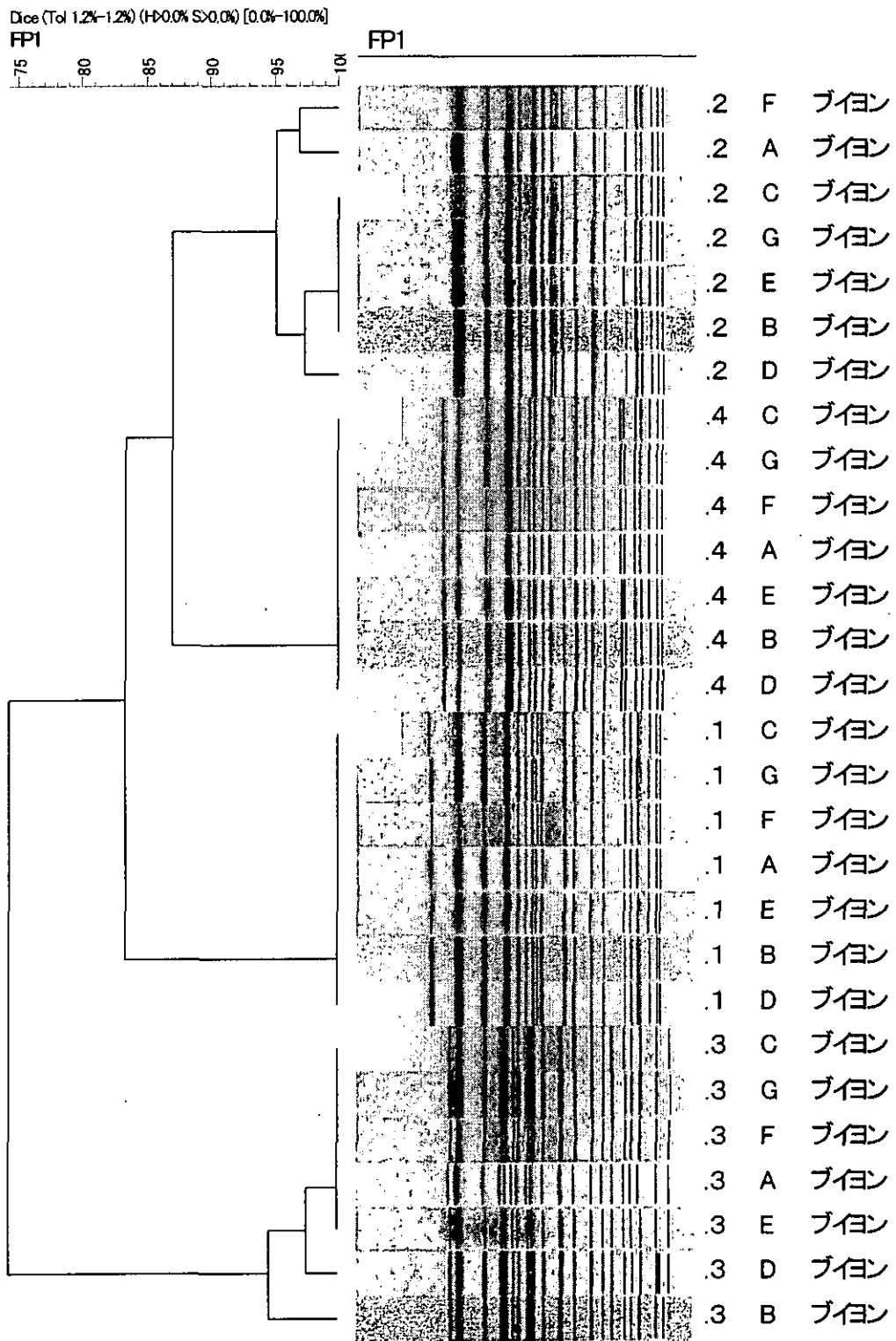


図 2 7 各施設間の 0157 (ブイオン) デンドログラム